

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

23.04.99

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 4月24日

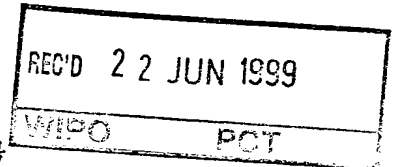
出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第131159号

出 願 人
Applicant (s):

国際試薬株式会社
旭化成工業株式会社

091673937

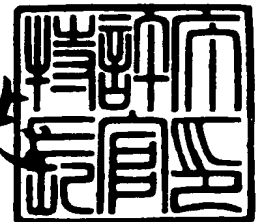
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 6月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 一



出証番号 出証特平11-3035380

【書類名】 特許願

【整理番号】 9804K05

【提出日】 平成10年 4月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/00
G01N 33/50

【発明の名称】 酵素の安定化方法及び酵素組成物

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際試薬株式会社
研究開発センター内

【氏名】 馬場 利幸

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際試薬株式会社
研究開発センター内

【氏名】 田畑 光正

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際試薬株式会社
研究開発センター内

【氏名】 永松 剛

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市西区室谷 1 丁目 1 番 2 国際試薬株式会社
研究開発センター内

【氏名】 渡津 吉史

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県田方郡大仁町三福 6 3 2 番の 1 旭化成工業株式
会社内

【氏名】 青木 亮治

【特許出願人】

【識別番号】 000170565

【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000000033

【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100091834

【弁理士】

【氏名又は名称】 室田 力雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 004868

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9803561

【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素の安定化方法及び酵素組成物

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも 1 種の酵素を安定化する安定化成分としてバリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含ませることを特徴とする酵素の安定化方法。

【請求項 2】 媒体が血清であることを特徴とする請求項 1 に記載の酵素の安定化方法。

【請求項 3】 媒体が緩衝液であることを特徴とする請求項 1 に記載の酵素の安定化方法。

【請求項 4】 媒体が可溶性蛋白質溶液であることを特徴とする請求項 1 に記載の酵素の安定化方法。

【請求項 5】 酵素を安定化する安定化成分としてバリン及びプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含有し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも 1 種の酵素及び含水媒体を含有することを特徴とする酵素組成物。

【請求項 6】 媒体が血清であることを特徴とする請求項 5 に記載の酵素組成物。

【請求項 7】 媒体が緩衝液であることを特徴とする請求項 5 に記載の酵素組成物。

【請求項 8】 媒体が可溶性蛋白質溶液であることを特徴とする請求項 5 に記載の酵素組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、コントロール物質等において、媒体中に含まれる酵素を安定化する方法及び酵素組成物に関する。前記コントロール物質は、例えば人の血液中に含まれる酵素の量を検出する検査等において、一定量の酵素を成分として含有させ

たものをコントロール物質として用い、このコントロール物質を検出装置にかけることで、その検出装置が酵素等の正しい値を検出できる状態にあるか否かを検証し、或いはコントロール物質の検出数値を予め得ておくことで、実際の被検査体において得られた検出数値から正確な酵素の量を比例配分等によって得るのに用いられている。

【0002】

【従来の技術】

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (Aspartate aminotransferase EC 2.6.1.1、以下ASTと略す) は、アスパラギン酸及び α -ケトグルタル酸からグルタミン酸及びオキザロ酢酸を生成する酵素で、心臓、肝臓、骨格筋に多く存在し、急性肝炎、慢性肝炎、心筋梗塞などの診断に有用な指標になる。

また、アラニンアミノトランスフェラーゼ (Alanine aminotransferase EC 2.6.1.2、以下ALTと略す) はアラニン及び α -ケトグルタル酸からグルタミン酸及びピルビン酸を生成する酵素で、肝臓、腎臓、心臓に多く存在し、ASTと同様に臨床診断に有用な指標である。

これらAST及びALTの血液中に含まれる量を検出するために行われる日常検査等においては、コントロール物質を用いて行う場合が多い。

従ってコントロール物質は、日常的な検査における検査値の安定性や信頼性を保証する上で、また精密且つ高度な技術が要求される臨床試験を行う上で、その取り扱いが重要となってきた。例えば、人の血液中に含まれるASTやALTの数値を検出する場合には、ASTやALTを含有させたコントロール物質を用いることになるが、上記したコントロール物質の役割を十分に果たすためには、コントロール物質に含有させた不安定な酵素であるASTやALTの酵素活性を十分に安定化させる必要がある。

このような観点から、コントロール物質中に含有せられた酵素の安定化を図る従来技術が、特開昭55-141194号公報、特開昭56-14829号公報、特開昭57-45453号公報等の開示されている。これらの従来技術においては、安定化成分として、エチレングリコール、ショ糖或いはグリセリンなどが用いられている。

また、アミノ酸を用いた酵素の安定化については、ハロルド等 (Harold L. Seg

al et.al. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.30(1), P.63~68, 1968) に代表されるように、過去から研究されてきた。

更に、コントロール物質であるコントロール血清の濁度を減少させるためにアミノ酸を用いた報告もあるが、何れにせよアミノ酸は蛋白質の変性を防ぐことができると考えられている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記エチレングリコール、ショ糖或いはグリセリン等の従来の安定化剤においては、その効果を発揮させるためには高濃度にする必要があった。即ち、エチレングリコールでは5 mol/L 程度、ショ糖では50~280mmol/L、及びグリセリンでは3.3mol/L程度は必要となり、添加濃度が高くなるためにコントロール物質そのものが高比重で且つ高粘性となり、パラメータとなるべきコントロール物質がヒト血清とは異なる物理的性質を持つといった問題が生じたのである。そしてこのような問題は、コントロール血清を近年の自動分析機に適用した場合に、サンプリングの精度が通常のヒト血清と異なることから機種間或いは施設間で測定値に差異が生じるという要因となって現れる等、コントロール血清本来の目的を達成できない状況を生じせしめている（日本臨床化学会、学術連絡委員会、臨床化学Vol.25(2), P.135~148, 1996)。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、このような問題を解決すべく、コントロール物質の濁度や蛋白質の変性に対して果たすアミノ酸の役割等の事実を出発点として、鋭意研究を重ねた結果、コントロール物質等に含まれる酵素、特にAST、ALT を安定化させるものとして、アミノ酸、特にバリン、プロリンが低濃度で酵素を安定化させることを見出し、本発明の酵素の安定化方法及び酵素組成物を完成するに至った。

【0005】

即ち本発明の酵素の安定化方法は、媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を安定化する安定化成分としてバリンとプロリンより選ばれたア

ミノ酸の少なくとも一方を含ませることを第 1 の特徴としている。

また本発明の酵素の安定化方法は、上記第 1 の特徴に加えて、媒体が血清であることを第 2 の特徴としている。

また本発明の酵素の安定化方法は、上記第 1 の特徴に加えて、媒体が緩衝液であることを第 3 の特徴としている。

また本発明の酵素の安定化方法は、上記第 1 の特徴に加えて、媒体が可溶性蛋白質溶液であることを第 4 の特徴としている。

また本発明の酵素組成物は、酵素を安定化する安定化成分としてバリン及びプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含有し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも 1 種の酵素及び含水媒体を含有することを第 5 の特徴としている。

また本発明の酵素組成物は、上記第 5 の特徴に加えて、媒体が血清であることを第 6 の特徴としている。

また本発明の酵素組成物は、上記第 5 の特徴に加えて、媒体が緩衝液であることを第 7 の特徴としている。

また本発明の酵素組成物は、上記第 5 の特徴に加えて、媒体が可溶性蛋白質溶液であることを第 8 の特徴としている。

【0006】

上記において、媒体は、酵素や安定化成分を溶かし或いは分散させる溶媒や分散媒等の母相或いは母材をいい、媒体に酵素と安定化成分を溶かし或いは分散させたものをコントロール物質として用いることができる。コントロール物質の媒体としては、例えば検出対象がヒト血清中に含まれるものである場合には、コントロール物質の媒体もヒト血清、或いはそれに処理を加えた類似のものを用いるのが好ましい。即ち、検査対象物に近い性質のものをコントロール物質の媒体として選ぶのが好ましい。

前記媒体としては、第 2 及び第 6 の特徴において開示するように、血清を用いることができる。第 2 及び第 6 の特徴において、血清とは、広い意味において、ヒト血清やその他の動物の血清、或いはそれらに処理を加えたものとする。

また媒体としては、第3及び第7の特徴において開示するように、緩衝液を用いることができる。

更に媒体としては、第4及び第8の特徴において開示するように、可溶性蛋白質溶液を用いることができる。

【0007】

上記の第1、第5の特徴において、安定化成分として酵素と共に含有せられるバリン、プロリンは、バリン単独、プロリン単独、及びバリンとプロリンの組み合わせの3つの場合がある。これらの安定化成分は、AST、ALTの各単独或いは両組み合わせを安定化するのに用いられて、良好な効果を発揮するのは勿論である。が、他の酵素に対する安定化成分として用いる場合も本発明の範囲内である。

また上記の特徴において、媒体中に酵素としてASTを含ませたものは、コントロール物質として、典型的には、人の血液中に含まれるASTの量を検出する場合に用いることができる。また媒体に酵素としてALTを含ませたものは、コントロール物質として、典型的には、人の血液中に含まれるALTの量を検出する場合に用いられる。

コントロール物質に含ませるAST、ALTの起源は特に限定しないが、例えばウシ心臓、ブタ心臓、ヒト心臓、血清、赤血球、尿等の生体材料、さらにヒト細胞を培養したもの、或いはヒト由来遺伝子を組み込んだ形質転換体を培養することにより得ることができる。

上記第2、第6の特徴において、媒体が血清である場合には、その血清に酵素と安定化成分としてのアミノ酸を含ませてなるコントロール物質はコントロール血清ということになる。

上記第3、第7の特徴において、媒体が緩衝液である場合としては、例えばウシ血清アルブミンを溶かしたBES緩衝液を用いることができる。が、実際に検査装置にかけられる検査対象物（厳密には検査対象物の媒体）の種類や状態に対応して、物理的に或いは化学的に似た性質を持つようにするため、種々の物質を緩衝液に溶解したものをを用いることができる。本発明はこの様な場合も含むものとする。

上記第4、第8の特徴において、媒体が可溶性蛋白質溶液である場合としては、BSA、ヒト血清アルブミン(HSA)、ゼラチン等の水溶液があげられるが、これらを1種または2種以上組み合わせて使用することができる。

【0008】

上記したバリリン或いはプロリンを用いて酵素の安定化を図る場合には、多量のバリリン、プロリンを溶媒に添加することなく、低濃度で、よってコントロール物質が高比重、高粘性となることなく、酵素の安定化を図ることができる。さらにバリリン、プロリンはAST、ALT以外の酵素の安定化に負の影響を及ぼすものではなかった。

前記バリリン、プロリンを酵素AST又はALTを含むコントロール血清の安定化成分として用いる場合、バリリン単独の場合の含有量は0.5～100mmol/Lとする。そしてより好ましくは、バリリンの含有量を10～20mmol/Lとする。このような範囲とすることで安定化の効果が良好で、しかも物理的・化学的性質も検査対象である血清と近いものとすることができる。

プロリン単独の場合の含有量は0.5～500mmol/Lとする。そしてより好ましくは、プロリンの含有量を100～500mmol/Lとする。

またバリリンとプロリンを組み合わせる場合の含有量は、バリリンは5～20mmol/L、プロリンは10～500mmol/Lとし、組み合わせられた総量は15～520mmol/Lとする。

以上のような範囲の含有量とすることで、安定化の効果が良好で、しかも物理的、化学的性質も検査対象である血清と近いものにするすることができる。よって得られるコントロール血清の物理的、化学的性質を常に検査対象である血清に近似させ、且つ安定性を確保することができ、得られたデータの値の信頼性を得ることができると共に、検査を行う施設間等での差異を無くすることができる。

【0009】

本発明の方法により、バリリン、プロリンを安定化成分とし、ASTやALTを酵素成分としたコントロール血清の製造の例を説明する。

ヒト血清を用い、これを予め56℃で4時間熱処理することにより、内因性の酵素を失活させた後、0.2 μm のメンブランフィルターで除菌濾過する（これをヒ

ト血清ベースと称する)。このヒト血清ベース(媒体)に、例えば10mmol/Lのバリンを溶解し、更にAST 又はALT を一定量溶解することで、バリンを安定化成分としたAST 又はALT を含むコントロール血清を得ることができる。

また前記ヒト血清ベースに、例えば100mmol/L のプロリンを溶解し、更にAST 又はALT を一定量溶解することで、プロリンを安定化成分としたAST 又はALT を含むコントロール血清を得ることができる。

【0010】

同様に本発明の方法により、バリン、プロリンを安定化成分とし、AST やALT を酵素成分とし、緩衝液を媒体としたコントロール物質の製造の例を説明する。

20mmol/LのBES 緩衝液に、ウシ血清アルブミンを3%含有させ、これを除菌濾過する(pH7.4、これをBSA ベースと称する)。このBSA ベースに、例えば10mmol/Lのバリンを溶解し、更にAST 又はALT を一定量溶解することで、バリンを安定化成分としたAST 又はALT を含む緩衝液媒体のコントロール物質を得ることができる。

また前記BSA ベースに、例えば100mmol/L のプロリンを溶解し、更にAST 又はALT を一定量溶解することで、プロリンを安定化成分としたAST 又はALT を含む緩衝液媒体のコントロール物質を得ることができる。

【0011】

尚、本発明の方法を用いて得られるコントロール物質は通常の使用時において液体であるが、保存状態としては、凍結乾燥品、冷凍保存品、凍結液状品等、液体以外の状態であってもよい。コントロール物質がその状態として液状以外の場合であってもよい。

【0012】

【実施例】

以下、本発明の実施例を説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例 1

コントロール物質中のAST 又はALT に対する各種アミノ酸の安定化効果の確認媒体としてヒト血清ベースとBSA ベースをそれぞれ用い、それらの各媒体に対

して安定化成分として、アミノ酸無添加のもの、アミノ酸としてバリンを10mmol/L加えたもの、プロリンを10mmol/L加えたもの、その他のアミノ酸を10mmol/L加えたものを作り（ただし、チロシンは1mmol/L）、さらにそれらに対して、酵素としてASTを約100U/Lになるように加え、また酵素としてALTを約100U/Lになるように加えて、コントロール物質を作製した。そして得られた各コントロール物質を45℃で4日間保持し、各コントロール物質に含まれるASTとALTの残存活性を測定した。

尚、使用するASTは旭化成工業株式会社製のヒト肝遺伝子組換え体由来のもの（以下、r-ASTと略す）を用いた。また、ALTは旭化成工業株式会社製のヒト肝遺伝子組換え体由来のもの（以下、r-ALTと略す）を用いた。

ASTとALTの残存活性の測定は、ASTについては国際試薬株式会社製のAST試薬L「コクサイ」を用いて測定した。またALTについては国際試薬株式会社製のALT試薬L「コクサイ」を用いて測定した。

結果を表1に示す。

【0013】

【表 1】

安定化成分 アミノ酸 (10mmol/L)	媒 体			
	BSA ベース		ヒト血清ベース	
	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)
無添加	53	32	41	20
バリン	85	62	71	55
プロリン	73	61	54	35
アラニン	39	28	33	15
ロイシン	46	28	40	20
イソロイシン	50	28	42	18
メチオニン	48	31	40	20
トリプトファン	52	30	38	18
フェニルアラニン	53	31	40	19
グリシン	53	30	40	19
セリン	52	32	40	19
トレオニン	50	31	37	18
システイン	47	24	32	14
チロシン	49	31	40	18
アスパラギン	41	25	37	14
グルタミン	43	15	32	17
リジン	53	31	39	20
ヒスチジン	47	28	36	15
アルギニン	50	30	39	18
アスパラギン酸	32	23	20	13
グルタミン酸	31	28	25	15

【0014】

表 1 から明らかなように、バリンとプロリンがAST、ALT に対して好ましい安定化効果を示した。

【0015】

実施例2

コントロール物質中のAST 又はALT に対するバリンの安定化効果の確認

ヒト血清ベース、BSA ベースにバリン及びr-AST、r-ALT を約100U/Lになるように加え、45℃で4日間保存し、残存活性を測定した。AST、ALT の活性測定は実施例1と同様に操作を行った。

結果を表2に示す。

【0016】

【表2】

安定化成分 バリン濃度 (mmol/L)	媒 体			
	BSA ベース		ヒト血清ベース	
	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)
0	53	32	41	20
0.5	65	38	47	28
5	74	46	52	33
10	85	62	71	55
20	82	65	73	56
50	83	64	73	56
100	82	65	72	55

【0017】

表2から明らかなように、BSA ベースでは、バリン無添加の場合のAST、ALT の残存率はそれぞれ53%、32%であるのに対して、バリンを0.5mmol/L 添加することによりAST、ALT の残存率がそれぞれ65%、38%となり安定性が向上した。またバリン濃度が10mmol/Lの場合におけるAST、ALT の残存率は、それぞれ85%、62%であり、バリン濃度が20mmol/Lの場合におけるAST、ALT の残存率は、それぞれ82%、65%であり、更にバリン濃度が100mmol/L の場合におけるAST、ALT の残存率は、それぞれ82%、65%であった。

またヒト血清ベースでも、同様にバリリン無添加の場合のAST、ALTの残存率は、それぞれ41%、20%であったが、バリリンを0.5mmol/L添加することによりAST、ALTの残存率がそれぞれ47%、28%となり安定性が向上した。またバリリン濃度が10mmol/LのときのAST、ALTの残存率は、それぞれ71%、55%であり、バリリン濃度が20mmol/Lの場合におけるAST、ALTの残存率は、それぞれ73%、56%であり、更にバリリン濃度が100mmol/Lの場合におけるAST、ALTの残存率は、それぞれ72%、55%であった。

以上よりバリリンの濃度は0.5～100mmol/Lとするのが良く、より好ましくは10～20mmol/Lとするのがよいことが判った。

【0018】

実施例3

コントロール物質中のAST又はALTに対するプロリンの安定化効果の確認

媒体としてヒト血清ベースとBSAベースをそれぞれ用い、それらの各媒体に対して安定化成分として、プロリン無添加のもの、プロリンをそれぞれ0.5、10、100、300、500mmol/L加えたものを作り、さらにそれらに対して、酵素としてr-ASTを約100U/Lになるように加え、また酵素としてr-ALTを約100U/Lになるように加えて、コントロール物質を作製した。そして得られた各コントロール物質を45℃で4日間保持し、各コントロール物質に含まれるASTとALTの残存活性を測定した。AST、ALTの活性測定は実施例1と同様に操作を行った。その結果を表3に示す。

【0019】

【表 3】

安定化成分	媒 体			
プロリン濃度 (mmol/L)	BSA ベース		ヒト血清ベース	
	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)	AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)
0	53	32	41	20
0.5	60	41	49	34
10	65	57	54	43
100	74	69	67	65
300	84	84	82	83
500	84	85	85	88

【0020】

表 3 から明らかなように、BSA ベースでは、プロリン無添加の場合にAST、ALT の残存率がそれぞれ53%、32%であるのに対して、プロリンを0.5mmol/L 添加することにより、AST、ALT の残存率がそれぞれ60%、41%となり、安定性の効果が向上した。プロリンを100mmol/L 添加することにより、AST、ALT の残存率がそれぞれ74%、69%となり、プロリン濃度が300mmol/L の場合のAST、ALT の残存率は、それぞれ84%、84%であり、更にプロリン濃度が500mmol/L の場合のAST、ALT の残存率は、それぞれ84%、85%であった。

またヒト血清ベースでも同様にAST、ALT のプロリン無添加のときの残存率は、それぞれ41%、20%であったが、プロリンを0.5mmol/L 添加することによりAST、ALT の残存率がそれぞれ49%、と34%となり安定性が向上した、またプロリンを100mmol/L 添加することによりAST、ALT の残存率がそれぞれ67%、と65%となり、プロリンを300mmol/L 添加することによりAST、ALT の残存率がそれぞれ82%、と83%となり、更にプロリン濃度が500mmol/L の時のAST ALT の残存率は、それぞれ85%、88%であった。

以上よりプロリンの濃度は0.5～500mmol/L とするのが良く、より好ましくは100～300mmol/L とするのがよいことが判った。

【0021】

実施例 4

コントロール物質中のAST、ALT に対するバリンとプロリンを組み合わせたときの安定化効果の確認

ヒト血清ベースにバリン、プロリン及びr-AST、r-ALT を約100U/Lになるように加え、45℃で4日間保存し、残存活性を測定した。AST、ALT の活性測定は実施例1と同様に操作を行った。その結果を表4に示す。

【0022】

【表 4】

安 定 化 成 分		媒 体	
バリン濃度 (mmol/L)	プロリン濃度 (mmol/L)	ヒト血清ベース	
		AST 残存率 (%)	ALT 残存率 (%)
0	0	41	20
0	10	54	43
0	100	67	65
0	300	82	83
0	500	85	88
5	0	52	33
5	10	66	54
5	100	76	77
5	300	85	88
5	500	89	90
10	0	71	55
10	10	76	75
10	100	82	86
10	300	90	92
10	500	92	92
20	0	73	56
20	10	78	79
20	100	84	85
20	300	90	92
20	500	94	94

【0023】

表 4 で明らかなように、アミノ酸無添加の場合のAST の残存率が41%であり、これに対してバリンを単独で5mmol/L 添加したときの残存率が52%で、プロリン

を単独で10mmol/L添加したときの残存率は54%となり、更にバリンを5mmol/L とプロリンを10mmol/L添加したときの残存率は66%となり、それぞれのアミノ酸を単独で用いた場合より安定性が向上した。

また、アミノ酸無添加の場合のALT の残存率は20%であったが、バリンを単独で5mmol/L 添加した場合の残存率は33%、プロリンを単独で10mmol/L添加した場合の残存率は43%となり、更にバリンを5mmol/L とプロリンを10mmol/L添加したときの残存率は54%となり、それぞれのアミノ酸を単独で用いた場合より安定化が向上した。

またバリンを20mmol/Lに対してプロリンを10mmol/Lを組み合わせた場合のAST の残存率は78%で、ALT の残存率は79%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを100mmol/L を組み合わせた場合のAST の残存率は84%で、ALT の残存率は85%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを300mmol/L を組み合わせた場合のAST の残存率は90%で、ALT の残存率は92%、バリンを20mmol/Lに対してプロリンを500mmol/L を組み合わせた場合のAST の残存率は94%で、ALT の残存率は94%であった。

以上よりバリンとプロリンとを組み合わせる場合には、バリンを5～20mmol/L、プロリンを10～500mmol/L とするのがよく、組み合わせられた総量が15～520mmol/L とするのがよいのが判った。またこの濃度では、比重、粘度等はヒト血清に近似したものであった。

【0024】

実施例5

起源の異なるAST、ALT に対するバリン、プロリンの安定化効果の確認

ヒト血清ベースに安定化成分としてバリンを10mmol/L、プロリンを100mmol/L を含有させたもの、及び含有させないものを作り、これらに対して起源の異なる幾つかのAST、ALT をそれぞれ約100U/Lになるように加え、コントロール物質を作製した。各コントロール物質を45℃で4日間保存し、残存活性を測定した。AST、ALT の活性測定は実施例1と同様に操作を行った。その結果を表5に示す。

【0025】

【表5】

酵素名	由 来	残存率 (%)	
		安定化成分無し	安定化成分有り
AST	ヒト肝遺伝子組換え体	41	90
AST	ブタ心筋	44	93
AST	ヒト心筋	43	94
ALT	ヒト肝遺伝子組換え体	20	92
ALT	ブタ心筋	21	91
ALT	ヒト心筋	20	90

【0026】

表5から明らかなように、各種起源の異なるAST、ALTに対してもバリン、プロリンによる安定化効果があることがわかった。

【0027】

【発明の効果】

本発明は以上の構成、作用からなり、請求項1に記載の酵素の安定化方法によれば、媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を安定化する安定化成分としてバリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含ませているので、

バリンとプロリンの各単独またはそれらの両方の含有により、媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ若しくはアラニンアミノトランスフェラーゼ又はその組み合わせにおける媒体中での変性を抑制し、安定化させることが可能となった。

またアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを含むコントロール物質等を安定化成分により安定化させることが可能となり、それらをアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ或いはアラニンアミノトランスフェラーゼを検出対象とする検査等において、安定した正確な検出データを得ることが可能となった。特に、前記アスパラギン酸アミノトランスフェ

ラーゼ或いはアラニンアミノトランスフェラーゼに対して、バリン又はプロリン又はその組み合わせが安定化成分として用いられることで、それらバリンやプロリンの少ない含有量でもってそれら酵素の安定化を十分に図ることができる。

また請求項 2 に記載の酵素の安定化方法によれば、上記請求項 1 に記載の構成による効果に加えて、媒体が血清であるので、

血清中に含まれるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼの検出を行う場合に、媒体である血清の中にアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼとその安定化成分であるバリンやプロリンと一緒に加えたコントロール物質等を用いることができ、物理的、科学的に似た良好な環境下での検出が可能となる。

また請求項 3 に記載の酵素の安定化方法によれば、上記請求項 1 に記載の構成による効果に加えて、媒体が緩衝液であるので、

緩衝液という安定した媒体中において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを安定化成分であるバリンやプロリンにより安定化させることができる。勿論、緩衝液には必要に応じて種々の成分を溶解させることで、検査対象物質（溶媒）と類似の物理的、科学的性質を有するコントロール物質を提供することができる。

また請求項 4 に記載の酵素の安定化方法によれば、上記請求項 1 に記載の構成による効果に加えて、媒体が可溶性蛋白質溶液であるので、

可溶性蛋白質溶液中におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを安定化成分であるバリンやプロリンにより安定化させることができる。

また請求項 5 に記載の酵素組成物によれば、酵素を安定化する安定化成分としてバリン及びプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含有し、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも 1 種の酵素及び含水媒体を含有するので、

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ若しくはアラニンアミノトランスフェラーゼ又はその組み合わせからなる酵素が、バリン若しくはプロリン又はその組み合わせからなる安定化成分の少ない量によって十分に安定化せられた酵素組

成物を提供することができる。

また請求項 6 に記載の酵素組成物によれば、請求項 5 に記載の構成による効果に加えて、媒体が血清であるので、

血清という媒体中において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ若しくはアラニンアミノトランスフェラーゼ又はその組み合わせからなる酵素が、バリン若しくはプロリン又はその組み合わせからなる安定化成分の少ない量によって十分に安定化せられた酵素組成物を提供することができる。

また請求項 7 に記載の酵素組成物によれば、請求項 5 に記載の構成による効果に加えて、媒体が緩衝液であるので、

緩衝液という媒体中において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ若しくはアラニンアミノトランスフェラーゼ又はその組み合わせからなる酵素が、バリン若しくはプロリン又はその組み合わせからなる安定化成分の少ない量によって十分に安定化せられた酵素組成物を提供することができる。

また請求項 8 に記載の酵素組成物によれば、請求項 5 に記載の構成による効果に加えて、媒体が緩衝液であるので、

可溶性蛋白質溶液という媒体中において、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ若しくはアラニンアミノトランスフェラーゼ又はその組み合わせからなる酵素が、バリン若しくはプロリン又はその組み合わせからなる安定化成分の少ない量によって十分に安定化せられた酵素組成物を提供することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼやアラニンアミノトランスフェラーゼを低濃度の安定化成分の含有により安定化させることができる酵素の安定化方法及び酵素組成物の提供を課題とする。

【解決手段】 媒体中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ及びアラニンアミノトランスフェラーゼからなる群より選ばれる少なくとも1種の酵素を安定化する安定化成分としてバリンとプロリンより選ばれたアミノ酸の少なくとも一方を含ませる。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000170565
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
【氏名又は名称】 国際試薬株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000000033
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
【氏名又は名称】 旭化成工業株式会社

【代理人】

申請人
【識別番号】 100091834
【住所又は居所】 兵庫県神戸市中央区海岸通6番地 建隆ビル2 5
階
【氏名又は名称】 室田 力雄

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000170565]

1. 変更年月日 1990年 8月21日
[変更理由] 新規登録
住 所 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号
氏 名 国際試薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000000033]

1. 変更年月日 1990年 8月16日
[変更理由] 新規登録
住 所 大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号
氏 名 旭化成工業株式会社

